

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.262:57.083.18

О. В. Ястребова^a, И. А. Кошелева^c, Е. Г. Плотникова^{a,b}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^c Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушchino, Россия

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНСОРЦИУМА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ТЕХНОГЕННЫХ ПОЧВ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

Из почвы района солеразработок (г. Березники, Пермский край), выделен бактериальный консорциум SMB1, способный к эффективному росту на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии до 10% NaCl. В его состав входят два галотолерантных деструктора нафталина рода *Arthrobacter* (штаммы SMB145 =ВКМ Ac-2551, SMB11 =ВКМ Ac-2552), а также галотолерантный штамм *Brevibacterium permense* SMB14 (=ВКМ Ac-2280^T=LMG 22207^T) и галофильный штамм *Chromohalobacter* sp. SMB17, не утилизирующие нафталин. При совместном культивировании трех штаммов: *Arthrobacter* sp. SMB145, *Brevibacterium permense* SMB14 и *Chromohalobacter* sp. SMB17 на нафталине при повышенной минерализации среды (7% NaCl) наблюдались более высокие ростовые показатели штамма-деструктора *Arthrobacter* sp. SMB145 по сравнению с аналогичными данными, полученными при его культивировании индивидуально. Интенсивность дыхания бактериального консорциума SMB1 также была выше таковой штамма SMB145 при выращивании на нафталине в присутствии 5%-ного NaCl. Выделенный бактериальный консорциум SMB1 может быть рекомендован для разработки новых биотехнологий очистки загрязненных почв и стоков в условиях засоления.

Ключевые слова: биодegradация; полициклические ароматические углеводороды; ассоциации бактерий; галотолерантные и галофильные бактерии.

O. V. Yastrebova^a, I. A. Kosheleva^c, E. G. Plotnicova^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

^c G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Russian Federation

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL CONSORTIUM, ISOLATED FROM TECHNOGENIC SOILS OF THE VERKHNEKAMSK SALT DEPOSIT

The consortium of microorganisms SMB1, capable of efficient growing on naphthalene as a sole source of carbon and energy in the presence of 10% NaCl has been isolated from soil of potassium salt mining region (Berezniki, Perm krai). The consortium consists of two halotolerant bacterial strains-destroyers of naphthalene, namely *Arthrobacter* sp. (strains SMB145 =BKM Ac-2551, SMB11 =BKM Ac-2552), halotolerant strain *Brevibacterium permense* SMB14 (=BKM Ac-2280^T=LMG 22207^T) and halophile strain *Chromohalobacter* sp. SMB17 incapable of naphthalene utilization. During co-cultivation of the three strains *Arthrobacter* sp. SMB145, *Brevibacterium permense* SMB14 and *Chromohalobacter* sp. SMB17 on naphthalene at 7% NaCl higher growth parameters of the strain destructor *Arthrobacter* sp. SMB145 have been observed compared to individual strain cultivation. The bacterial consortium SMB1 respiration rate was higher in comparison to the individual strain SMB145 cultivation on naphthalene at 5% NaCl. Isolated bacterial consortium SMB1 can be recommended for the development of new biotechnologies for the treatment of polluted soils and wastewater under the conditions of salinization.

Key words: biodegradation; polycyclic aromatic hydrocarbons; bacterial communities; halotolerant and halophilic bacteria.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относят к числу наиболее распространенных, экологически опасных, устойчивых соедине-

ний, накапливающихся в окружающей среде как в результате природных процессов, так и в результате промышленной деятельности человека. Способ-

ность к утилизации или трансформации ди- и трикольцевых ароматических углеводородов (нафталин, фенантрен) обнаружена у многих природных бактерий [Cerniglia 1992; Habe, Omori, 2003]. В ряде случаев загрязнение почв и водоемов промышленными отходами, содержащими токсичные соединения, сопровождается другими неблагоприятными факторами, в частности, повышенной концентрацией солей. В таких условиях возможность биодegradации ПАУ определяется устойчивостью бактерий к повышенной минерализации среды и способностью проявлять при этом биодegradативные свойства.

Из высокоминерализованных сред, таких как моря, лиманы, солончаковые болота, морские осадки, пластовые воды нефтедобычи выделены галотолерантные и галофильные бактерии, способные разлагать алканы, моно- и полиароматические углеводороды в условиях повышенной солености среды (1.0–10%) [Dalvi et al., 2012; Feng et al., 2012; Al-Mailem et al., 2013]. В литературе приводятся данные о способности штаммов родов *Archaeomonas*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Chromohalobacter* к деструкции моноароматических углеводородов (бензола, толуола, фенола, бензоата, салицилата) в присутствии 1–10%-ного NaCl в среде культивирования [Kim et al., 2008; Berlendis et al., 2010; Dalvi et al., 2012; Bonfa et al., 2013]. Бактериальная деструкция ПАУ, в частности нафталина, фенантрена и антрацена, при высокой солености среды (до 9% NaCl) описана для бактерий родов *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Martellella*, *Arthrobacter* [Плотникова и др., 2001; Ashok et al., 1995; Feng et al., 2012; Al-Mailem et al., 2013].

В ряде исследований показано, что сообщества микроорганизмов, выделенные из засоленных почв, солончаковых болот, прибрежных зон, более эффективно утилизируют ПАУ в условиях высокого засоления среды, чем индивидуальные штаммы-деструкторы [Tam, 2002; Dastgheib et al., 2012; Moghadam et al., 2014]. В составе бактериального консорциума Qphe, растущего на фенантрена в присутствии до 17% NaCl, выявлен штамм-деструктор фенантрена рода *Marinobacter* и штамм *Halomonas* sp., утилизирующий метаболиты фенантрена [Dastgheib et al., 2012]. На примере нафталин- и фенантрен- утилизирующих сообществ показано влияние повышенного засоления среды на филогенетический состав и активность ферментов штаммов-деструкторов микробного консорциума [Castle et al., 2006; Guo et al., 2016].

Из почв района разработок Верхнекамского месторождения солей (г. Березники, Пермский край) нами были выделены и описаны галотолерантные бактерии родов *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter* и *Pseudomonas*, способные к активной деструкции ПАУ (нафталина, фенантрена) при содержании 6–9% NaCl в ростовой среде [Плотникова и др., 2001, 2011]. Из образца засоленной почвы методом на-

копительного культивирования получена ассоциация бактерий (именуемая далее SMB1), растущая на нафталине как единственном источнике углерода и энергии в присутствии до 10% NaCl [Плотникова и др., 2001].

Цель настоящей работы – структурно-функциональная характеристика ассоциации бактерий SMB1, а также изучение влияния повышенных концентраций хлорида натрия на ростовые характеристики ассоциации и составляющих ее бактерий.

Материалы и методы исследования

Ассоциация бактерий, условия культивирования. Объектом исследования являлась ассоциация микроорганизмов SMB1, которая была изолирована методом накопительного культивирования из образца почвы, отобранной в районе солеразработок (г. Березники, Пермский край) [Плотникова и др., 2001]. Культивирование ассоциации проводили аэробно в 100 мл минеральной среды Раймонда [Розанова, Назина, 1982], содержащей нафталин (1 г/л) и 6% (вес/объем) NaCl, на термостатируемой качалке (100 об/мин) при 28°C. Последовательные пассажи ассоциации осуществляли каждые 2–3 недели путем выращивания при описанных выше условиях. Исследование данной ассоциации проводили после 2 месяцев культивирования.

Рост бактерий поддерживался в минеральной среде Раймонда с нафталином (штаммы SMB11 и SMB145), в полноценной среде Раймонда (штаммы SMB14 и SMB17), где в качестве субстратов использовались триптон («Sigma», Германия) и дрожжевой экстракт («Sigma», Германия) в концентрации 5 г/л и 2.5 г/л, соответственно. Содержание хлорида натрия в средах составляло 3%.

ДНК-типирование штаммов проводили методом РЕР-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся экстрагенетических палиндромных последовательностей ДНК, как описано Versalovic с соавт. [Versalovic et al., 1994].

Идентификация бактерий. Выделение тотальной ДНК бактерий проводили согласно работе M. Ferrero et al. [2002]. Для амплификации нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК использовали бактериальные праймеры 27F и 1492R, а ПЦР проводили при условиях, описанных Е.Ю. Гавриш с соавт. [Гавриш и др., 2004]. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК определяли с применением набора реактивов DYEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic analyser 3500XL (Applied Biosystems, США) и сравнивали с таковыми типовых штаммов близкородственных видов из базы данных GenBank с помощью программы CLUSTAL W.

Параметры роста бактерий в составе ассоциации SMB1 и индивидуально оценивали при выращивании их в жидкой минеральной среде Раймонда при 28°C с нафталином в качестве субстрата (1 г/л). При инкубировании бактерий на минеральной агаризованной среде (1.5%) нафталин добавляли в крышку перевернутой чашки Петри. Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при 600 нм и толщине кюветы 0.5 см. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом серийных разведений с последующим высевом и подсчетом колоний бактерий на чашках с агаризованной богатой средой Раймонда. Количество хлорида натрия в средах культивирования варьировали от 0 до 10%.

Для изучения взаимного влияния штаммов на характер роста в составе ассоциации проводились эксперименты по их совместному культивированию в жидкой минеральной среде Раймонда с нафталином (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии 3, 5 и 7% NaCl. В качестве посевного материала использовали суспензии штаммов *Arthrobacter* sp. SMB145, *B. permense* SMB14 и SMB17 в экспоненциальной фазе роста с титром клеток около 10^4 КОЕ. Морфологические различия колоний штаммов позволили исследовать особенности роста отдельных штаммов в составе ассоциации. КОЕ каждого штамма определяли методом серийных разведений с последующим высевом и подсчетом колоний бактерий на чашках с агаризованной полноценной средой Раймонда.

Интенсивность дыхания бактерий измеряли с использованием респирометра Micro-Oxymax respirometer (Columbus Instruments International Corp. Columbus, OH). Накопление CO₂ и потребление O₂ измерялось сенсорами одновременно через

определенные интервалы времени. В ходе эксперимента использовались 250-мл флаконы, содержащие 100 мл минеральной среды Раймонда и нафталин в качестве субстрата в концентрации 0.5 мг/мл. Содержание хлорида натрия в среде культивирования составляло 0 и 5%. В качестве посевного материала использовали суспензии штаммов *Arthrobacter* sp. SMB145, *B. permense* SMB14 и SMB17 в экспоненциальной фазе роста с титром клеток около 10^4 КОЕ.

Результаты и их обсуждение

Выделение и состав бактериального сообщества SMB1. Сообщество микроорганизмов SMB1, выделенное из почвы района солеразработок (г. Березники, Пермский край), способно к эффективному росту на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии до 10% NaCl. Установлен состав консорциума SMB1: грамположительные бактерии-деструкторы нафталина – *Arthrobacter* sp. SMB11 и *Arthrobacter* sp. SMB145, а также штаммы *Brevibacterium* sp. SMB14 и *Chromohalobacter* sp. SMB17, не способные утилизировать нафталин.

Грамположительный штамм SMB14 образовывал матовые колонии, которые на свету приобретали ярко-оранжевую окраску. На основании проведенных исследований штамм SMB14 был описан как новый вид *Brevibacterium permense* (=VKM Ac-2280^T) [Гавриш и др., 2004]. Данный штамм способен к росту на бензойной и *para*-оксибензойной кислотах как единственном источнике углерода и энергии. *B. permense* SMB14 растет на полноценной среде Раймонда как без добавления NaCl, так и при повышенной концентрации соли – до 12% (таблица).

Рост микробного сообщества SMB1 и индивидуальных штаммов на агаризованной минеральной среде Раймонда в присутствии разных концентраций NaCl

Штамм	Рост на минеральной среде с нафталином					Рост на полноценной среде						
	Без NaCl	3%	7%	10%	14%	Без NaCl	3%	6%	12%	18%	24%	29%
SMB11	+	+	+	–	–	+	+	+	±	–	–	–
SMB145	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–
SMB14	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–
SMB17	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	±	±
SM1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±

Примечание. «+» – рост (колонии размером 1–3 мм); «±» – слабый рост (колонии размером менее 1 мм); «–» – отсутствие роста бактерий.

Штамм SMB17 при росте на полноценной агаризованной среде образует прозрачные, плоские колонии желтоватого цвета. Клетки – подвижные палочки. Грамотрицательный, аэроб, каталазо- и оксидазоположителен. Растет на средах при 3–29% NaCl и не растет в отсутствие соли, т.е. является галофильным микроорганизмом [Кашнер, 1981] (таблица). Сравнительный анализ нуклеотидной

последовательности 16S рДНК (около 1470 п.н.) показал, что штамм входит в филогенетический кластер, включающий представителей рода *Chromohalobacter*, наиболее близок (около 99%) к *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T [Arahal et al., 2001], *Chromohalobacter beijerinckii* ATCC 19372^T [Peçonek et al., 2006] и *Chromohalobacter japonicus* [Sánchez-Porro et al., 2007]. Дан-

ный штамм растет в минеральной среде с бензойной и *para*-оксибензойной кислотами в качестве субстрата.

Штаммы SMB11 и SMB145 на корине-бактериальном агаре образовывали круглые ровные, выпуклые, блестящие светло-желтые колонии. Изучение физиолого-биохимических и генетических характеристик позволили отнести вышеперечисленные штаммы к роду *Arthrobacter* (группе «*A. globiformis*») [Определитель..., 1997]. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммов (около 1400 п.н.) выявил 99.7%-ное сходство со штаммом *A. crystallopoietes* DSM 20117^T [Ensign, Rittenberg, 1963]. В то же время, штаммы SMB11 и SMB145 отличались морфологическими характеристиками (цвет, размер колоний при выращивании на полноценной среде Раймонда). Проведенный анализ REP-ПЦР профилей показал различия в организации геномов этих штаммов, что указывает на неидентичность изолятов (рис. 1).



Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации REP-ПЦР штаммов *Arthrobacter* spp., выделенных из сообщества микроорганизмов SMB1: М – маркер 1 kb («Силекс», Россия), 1 – SMB145, 2 – SMB11

Штаммы-деструкторы *Arthrobacter* spp. SMB11 и SMB145 являются галотолерантными микроорганизмами: растут на полноценной среде как в отсутствие, так и в присутствии NaCl (до 12%) [Кашнер, 1981]. На полноценной среде Раймонда данные штаммы способны к росту при концентрации NaCl от 0 до 12% (таблица).

Кроме того, штаммы *Arthrobacter* sp. SMB11, SMB145 растут на нафталине и фенантрена в качестве единственного источника углерода и энергии при концентрации до 7% NaCl. Данные штаммы способны использовать в качестве субстрата также салицилат, бензоат, *para*-гидроксibenзоат, ортофталевую кислоту, ацетат.

К настоящему времени имеются ограниченные сведения о микроорганизмах, осуществляющих деструкцию ПАУ в условиях высокой минерализа-

ции среды. Большинство подобных микроорганизмов-деструкторов было выделено из нефтезагрязненных морских отложений и воды и относятся к грамотрицательным бактериям [Dastgheib et al., 2012; Feng et al., 2012; Al-Mailem et al., 2013]. Описаны галотолерантные грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, утилизирующие ПАУ, в частности нафталин, при солености среды 0–10%. [Ashok et al., 1995; Kumar et al., 2007]. Ранее нами были обнаружены и охарактеризованы бактерии-деструкторы нафталина и фенантрена родов *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter* и *Pseudomonas*, утилизирующие ПАУ в присутствии NaCl до 6% [Плотникова и др., 2001; Ястребова и др., 2008; Anan'ina et al., 2011].

Рост ассоциации бактерий SMB1 и штаммов-деструкторов на нафталине при повышенной солености среды. При росте ассоциации на агаризованной минеральной среде в парах нафталина наблюдалось формирование биопленки на агаре при содержании хлорида натрия до 14% (таблица). В то же время, эффективный рост сообщества в жидкой минеральной среде на нафталине как единственном источнике углерода и энергии был зафиксирован при содержании соли не более 8%. Наибольшие показатели роста сообщества были установлены в отсутствие NaCl в ростовой среде ($OD_{540}=0.66$ оптических единиц), тогда как в присутствии 5, 7 и 8%-ного NaCl оптическая плотность культуры уменьшалась и достигала 0.25, 0.19 и 0.11 оптических единиц, соответственно.

Штаммы *Arthrobacter* sp. SMB11 и SMB145 растут на агаризованной и в жидкой минеральных средах с нафталином в качестве субстрата, как без соли, так и при содержании до 7% NaCl в среде культивирования (таблица). Кривые роста штамма *Arthrobacter* sp. SMB145 на среде с нафталином в присутствии различных концентраций хлорида натрия представлены на рис. 2. Наибольший титр клеток (1.9×10^8) достигается при отсутствии соли в среде культивирования, тогда как при 5%-ного NaCl максимальное число КОЕ – 2.1×10^7 , а при 7% – 1.1×10^6 . Максимальная скорость роста в отсутствие соли наиболее высокая и составляет 0.15 ч^{-1} , тогда как в присутствии 5 и 7%-ного NaCl достигает 0.024 и 0.02 ч^{-1} , соответственно. Таким образом, повышение концентрации соли в среде отрицательно влияет на ростовые характеристики *Arthrobacter* sp. SMB145 при выращивании на нафталине. Негативное влияние высокой солености среды на бактериальную деструкцию ПАУ может объясняться снижением растворимости ароматических углеводородов и доступности кислорода, а также ингибированием метаболических процессов бактериальных клеток при высокой минерализации среды [McGenity, 2010; Martins, Peixoto, 2012; Guo et al., 2016].

Рост штаммов на нафталине в составе ассоциации (модельный эксперимент). Изучены ростовые характеристики штаммов микробной ассоциации *Arthrobacter* sp. SMB145, *Brevibacterium permense* SMB14 и *Chromohalobacter* sp. SMB17 при культивировании в минеральной среде Раймонда на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии 7% соли. Установлено, что у штамма *Arthrobacter* sp. SMB145 происходило увеличение ростовых параметров при культивировании в сообществе, по сравнению с ростом чистой культуры при тех же условиях (рис. 2, 3). Максимальное значение КОЕ штамма достигало 3.4×10^7 за 190 ч. культивирования в сообществе (рис. 3), в то время как при росте индивидуальной культуры – 1.1×10^6 за 215 ч. (рис. 2).

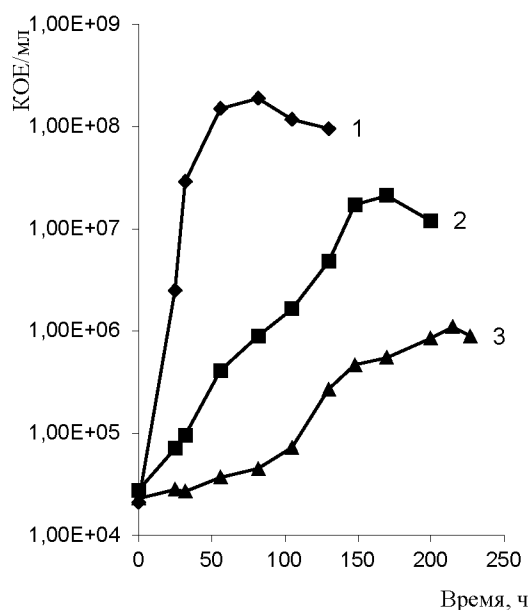


Рис. 2. Рост штамма *Arthrobacter* sp. SMB145 в минеральной среде Раймонда на нафталине в присутствии различных концентраций NaCl:

1 – без соли, 2 – 5% NaCl, 3 – 7% NaCl

В ряде исследований показана более эффективная деструкция ПАУ бактериальными сообществами, чем индивидуальными штаммами-деструкторами в тех же условиях вследствие более широкой субстратной специфичности и снижения концентрации токсичных метаболитов в процессе ко-метаболизма бактерий микробных сообществ [Casellas et al., 1998; Moghadam et al., 2014].

Интересно, что в эксперименте со смешанной культурой у *B. permense* SMB14 происходило увеличение значения КОЕ с 9.8×10^4 до 1.7×10^7 (рис. 3), в то время как при индивидуальном культивировании штамма на нафталине, как единственном источнике углерода и энергии, роста не наблюдалось.

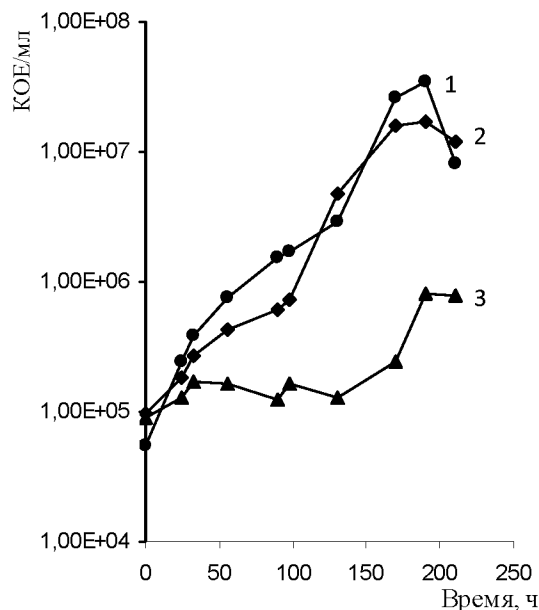


Рис. 3. Рост штаммов бактериального сообщества SMB1 в минеральной среде Раймонда на нафталине в присутствии 7%-ного NaCl:

1 – *Arthrobacter* sp. SMB145, 2 – *Brevibacterium permense* SMB14; 3 – *Chromohalobacter* sp. SMB17

Количество клеток галофильного штамма *Chromohalobacter* sp. SMB17 увеличивалось не более чем на порядок: с 9.1×10^4 до 8.0×10^5 (рис. 3). Данный штамм не способен к деструкции нафталина, однако стабильно поддерживается в данной нафталин-деградирующей микробной ассоциации. Как показали Tagger с соавторами, в состав нафталин-утилизирующего микробного сообщества входят бактерии, способные к росту на нафталине, а также бактерии, использующие в качестве ростового субстрата ряд органических кислот, образующихся штаммами-деструкторами при росте на нафталине [Tagger et al., 1990]. Можно предположить, что клетки галофильного штамма *Chromohalobacter* sp. SMB17 из исследуемого консорциума поддерживают свое существование в сообществе за счет продуктов метаболизма, накапливаемых в среде культивирования штаммами-деструкторами при росте на нафталине, а также лизиса клеток бактерий.

Интенсивность дыхания бактерий. В ряде исследований показана положительная корреляция между уровнем накопления углекислого газа и такими параметрами, как степень и скорость утилизации ПАУ [Bouchez et al., 1997; Zaidi, Imam, 1999]. Как показывает суммарное накопление углекислого газа (рис. 4), бактериальное сообщество SMB1 осуществляет более интенсивную деструкцию нафталина, по сравнению с индивидуальной культурой *Arthrobacter* sp. SMB145.

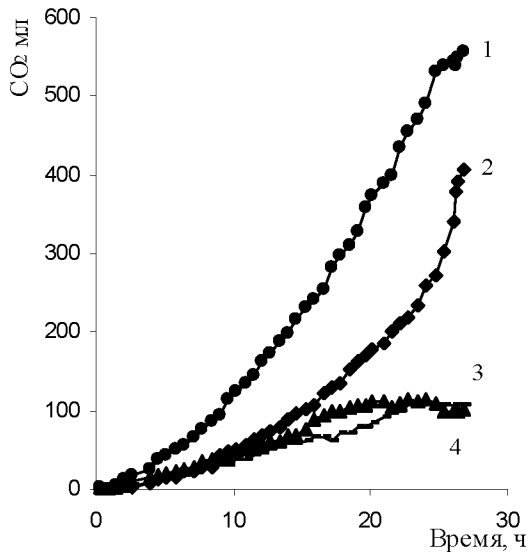


Рис. 4. Суммарное накопление CO_2 (мл) при выращивании бактериального сообщества SMB1 и чистых культур в минеральной среде Раймонда с нафталином (0,5 мг/мл) в присутствии 5%-ного NaCl:

1 – SMB1; 2 – SMB145; 3 – SMB14; 4 – контроль (среда Раймонда, нафталин)

При выращивании штамма *Brevibacterium permense* SMB14 накопление углекислого газа остается на уровне контроля, что свидетельствует об отсутствии деградации нафталина данной культурой.

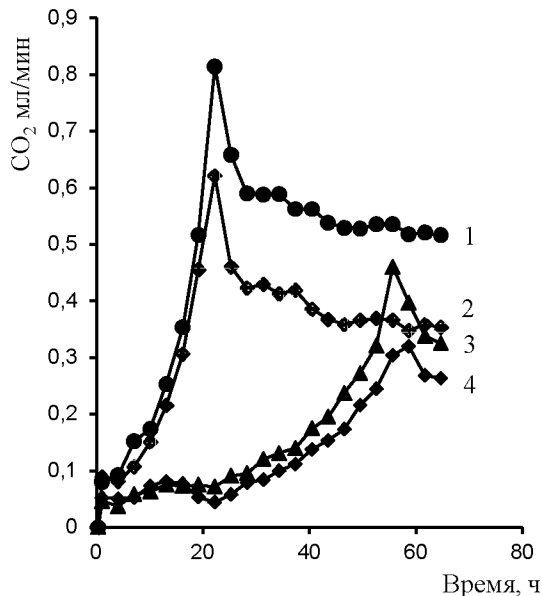


Рис. 5. Удельная скорость выделения CO_2 бактериального сообщества SMB1 и штамма SMB145 при выращивании в минеральной среде Раймонда с нафталином (0,5 мг/мл) и разной концентрацией NaCl:

1 – SMB1 (0% NaCl); 2 – SMB145 (0% NaCl); 3 – SMB1 (5% NaCl); 4 – SMB145 (5% NaCl)

Удельная скорость выделения CO_2 бактериального сообщества SMB1 была на 24% выше таковой штамма SMB145 в среде без добавления соли и на 30% выше в среде с 5%-ного NaCl (рис. 5), что также свидетельствует о более эффективной деградации нафталина сообществом SMB1 по сравнению со штаммом-деструктором *Arthrobacter* sp. SMB145.

Заключение

Выделенный бактериальный консорциум SMB1, растущий на нафталине как единственном источнике углерода в присутствии до 10% NaCl, включает два галотолерантных штамма-деструктора нафталина рода *Arthrobacter* (штаммы SMB11, SMB145), а также галотолерантный штамм *Brevibacterium permense* SMB14 и галофильный штамм *Chromohalobacter* sp. SMB17, не утилизирующие нафталин. В результате исследований установлено, что штамм-деструктор *Arthrobacter* sp. SMB145 менее эффективно растет на нафталине в условиях повышенного засоления среды при культивировании индивидуально, чем в составе бактериального сообщества SMB1. Можно предположить положительное влияние экзо-метаболитов галофильного штамма, обладающих осмопротекторными свойствами, таких как сахара, аминокислоты и их производные [Ventosa et al, 1998], на способность штаммов-деструкторов к росту и утилизации нафталина при повышенном засолении среды. В то же время штаммы сообщества, не утилизирующие нафталин, могут использовать в качестве субстрата метаболиты нафталина, выделяемые штаммами-деструкторами в среду культивирования.

Помимо вышеописанной микробной ассоциации, из образцов почв, отобранных в районе соле-разработок, было выделено еще несколько сообществ микроорганизмов, также деградирующих ПАУ при повышенных концентрациях хлорида натрия. В состав этих сообществ также входили галотолерантные бактерии-деструкторы ПАУ и сопутствующие галофильные и/или галотолерантные бактерии [Ананьина и др., 2005; Ананьина и др., 2007]. Прослеживается закономерность формирования в экосистемах с повышенным содержанием солей устойчивых аэробных микробных ассоциаций, способных использовать как источник углерода и энергии сложные органические соединения (нафталин) в условиях засоления. Изучение таких микробных сообществ, имеющих большой потенциал для использования их при биоремедиации засоленных почв, загрязненных полициклическими ароматическими углеводородами, внесет существенный вклад в понимание механизмов взаимоотношений отдельных штаммов микробного сообщества.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 16-44-590968 p_a.

Библиографический список

- Ананьина Л.Н., Алтынцева О.В., Плотникова Е.Г. Изучение сообщества микроорганизмов, выделенного из района солеразработок // Вестник Пермского университета. 2005. Вып. 6. Биология. С. 109–114.
- Ананьина Л.Н. и др. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov. – новая умеренно галофильная бактерия из ассоциации микроорганизмов, утилизирующей нафталин // Микробиология. 2007. Т. 76, № 3. С. 369–376.
- Гавриш Е.Ю. и др. Три новых вида бревибактерий - *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. и *Brevibacterium pertense* sp. nov. // Микробиология. 2004. Т. 73, № 2. С. 218–225.
- Кашинер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир. 1981. 365 с.
- Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир. 1997. Т. 1, 2.
- Плотникова Е.Г. и др. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. 2001. Т. 70, № 1. С. 61–69.
- Плотникова Е.Г. и др. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* – деструкторы полициклических ароматических углеводородов // Экология. 2011. № 6. С. 459–466.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Ястребова О.В., Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г. Бактерии рода *Bacillus*, выделенные из почв района солеразработок // Вестник Пермского университета. 2008. Вып. 9 (25). Биология. С. 58–62.
- Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia // Antonie Van Leeuwenhoek. 2011. Vol. 100, Is. 2. P. 309–316.
- Al-Mailem D.M., Eliyas M., Radwan S.S. Oil-bioremediation potential of two hydrocarbonoclastic, diazotrophic *Marinobacter* strains from hypersaline areas along the Arabian Gulfcoasts // Extremophiles. 2013. Vol. 17. P. 463–470.
- Arahal D.R. et al. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. // Int J Syst Evol Microbiol. 2001. Vol. 51. P. 1443–1448.
- Ashok, T., Saxena, S., Musarrat J. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery // Lett. Appl. Microbiol. 1995. Vol. 21, Is. 4. P. 246–248.
- Berlendis S. et al. First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 160. P. 1992–1999.
- Bonfa M.R.L. et al. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments // Biodegradation. 2013. Vol. 24. P. 699–709.
- Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.-P. An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 1087–1093.
- Casellas M. et al. Isolation and characterization of a fluorine-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium // Can. J. Microbiol. 1998. Vol. 44. P. 734–742.
- Castle D.M., Montgomery M.T., Kirchman D.L. Effects of naphthalene on microbial community composition in The Delaware estuary // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. Vol. 56. P. 55–63.
- Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Biodegradation. 1992. Vol. 3. P. 351–368.
- Dalvi S., Azetsu S., Patrauchan M.A., Aktas D.F., Fathepure B.Z. Proteogenomic elucidation of the initial steps in the benzene degradation pathway of a novel halophile, *Arhodomonas* sp. Strain Rozel, isolated from a hypersaline environment // Appl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78. P. 7309–7316.
- Dastgheib S.M.M. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 95. P. 789–798.
- Ensign J.C., Rittenberg S.C. A crystalline pigment produced from 2-hydro-xypridine by *Arthrobacter crvstallopites* n.sp. // Arch.Mikrobiol. 1963. Vol. 47. P. 137–153.
- Feng T.-C. et al. Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3 // Journal of Applied Microbiology. 2012. Vol. 113. P. 779–789.
- Ferrero M. et al. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western mediterranean region // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 957–962.
- Guo G. et al. Effect of salt contents on enzymatic activities and halophilic microbial community structure during phenanthrene degradation // International Biodeterioration & Biodegradation. 2016. Vol. 110. P. 8–15.
- Habe H., Omori T. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. Vol.

- 67, № 2. P. 225–243.
- Kim, D. et al. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2 // FEMS Microbiol. Lett. 2008. Vol. 280. P. 235–241.
- Kumar M. et al. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensionactive emulsifying agent // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 23. P. 211–220.
- Martins L.F., Peixoto R.S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // Brazilian Journal of Microbiology. 2012. P. 865–872.
- McGenity T.J. Halophilic hydrocarbon degraders. In: K. N. Timmis (ed). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin: Springer-Verlag, 2010. P. 1939–1951.
- Moghadam M.S. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments // Journal of Environmental Health Science & Engineering. 2014. 12:114 URL: <http://www.ijehse.com/content/12/1/114>.
- Pec,onek J. et al. Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and emended description of the species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. Vol. 56. P. 1953–1957.
- Sánchez-Porro C. et al. *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Japanese salty food // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57. P. 2262–2266.
- Tagger S., Truffaut N., Le Petit J. Preliminary study on relationship among strains forming a bacterial community selected on naphthalene from a marine sediment // Can. J. Microbiol. 1990. Vol. 36. P. 676–681.
- Tam N.F. et al. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. // Mar. Pollut. Bull. 2002. Vol. 45. P. 316–324.
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // Microbiology and Molecular biology reviews. 1998. Vol. 62, № 2. P. 504–544.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction // Meth. Mol. Cell. Biol. 1994. Vol. 5. P. 25–40.
- Zaidi B.R., Imam S.H. Factors affecting microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean Coastal Water // Marine Pollution Bulletin. 1999. Vol. 38, № 8. P. 737–742.
- [The study of microbial community isolated from the region of salt mining]. *Vestnik Permskogo universiteta*. 2005, Iss. 6. Biologija, pp. 109–114. (In Russ.).
- Anan'ina, L.N., Plotnikova, E.G., Gavrish, E.Yu., et al. [*Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium from the Association of Naphthalene_Degrading Microorganisms]. *Mikrobiologija*, 2007, V. 76, N. 3, pp. 369–376. (In Russ.).
- Gavrish, E.Yu., Krauzova, V.I., Potekhina, N.V., Karasev, S.G., Plotnikova, E.G., Altyntseva O.V., Korosteleva, L.A., Evtushenko, L.I., [Three New Species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov.]. *Mikrobiologija*. 2004, V. 73, N. 2, pp. 218–225. (In Russ.).
- Kushner, D.J. *Žizn' mikrobov v ekstremal'nykh uslovijach* [Microbial Life in Extreme Environments]. Moscow, Mir Publ., 1981. 365 p. (In Russ.).
- Opredelitel' bakterij Berdži* [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Bergey]. Moscow, Mir Publ., 1997. V. 1, 2. (In Russ.).
- Plotnikova E.G., Altyntseva O.V., Kosheleva I.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Gavrish E.U., Demakov V.A., Boronin A.M. [Bacteria Decomposing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Isolated from Soil and Bottom Sediments in the Region of Salt Mines]. *Mikrobiologija*, 2001, V. 70, N 1, pp. 61–69. (In Russ.).
- Plotnikova E.G., Yastrebova O.V., Anan'ina L.N., Dorofeeva L.V., Lysanskaya V.Ya., Demakov V.A. [Halotolerant bacteria of the genus *Arthrobacter* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons]. *Ėcologija*. 2011, V. 42, N 6, pp. 502–509. (In Russ.).
- Rozanova E.P., Nazina T.N., [Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria and Their Activity in Oil-Bearing Beds]. *Mikrobiologija*, 1982, V. 51, pp. 324–348. (In Russ.).
- Yastrebova O.V., Ananyina L.N., Plotnikova E.G. [Bacteria of the genus *Bacillus* isolated from soils in the area of salt mining]. *Vestnik Permskogo universiteta*. 2008, Iss. 9. Biology, pp. 58–62. (In Russ.).
- Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011, V. 100, I. 2, pp. 309–316.
- Al-Mailem D.M., Eliyas M., Radwan S.S. Oil-bioremediation potential of two hydrocarbonoclastic, diazotrophic *Marinobacter* strains from hypersaline areas along the Arabian Gulfcoasts. *Extremophiles*. 2013, V. 17, pp. 463–470.

References

Anan'ina, L.N., Altyntseva O.V., Plotnikova, E.G.,

- Arahal D.R., Garcia M.T., Ludwig W., Schleifer K.H., Ventosa A. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, V. 51, pp. 1443–1448.
- Ashok, T., Saxena, S., Musarrat J. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. *Lett. Appl. Microbiol.* 1995, V. 21, I. 4, pp. 246–248.
- Berlendis S., Cayol, J.-L., Verhe, F., Laveau S., Tholozan, J.-C., Ollivier, B. First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, V. 160, pp. 1992–1999.
- Bonfa M.R.L., Grossman M.J., Piubeli F., Mellado E., Durrant, L.R. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Biodegradation.* 2013, V. 24, pp. 699–709.
- Bouchez M., Blanchetl D., Vandecasteele J.-P. An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. *Microbiology.* 1997, V. 143, pp. 1087–1093.
- Casellas M., Grifoll M., Sebate J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a fluorine-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* 1998, V. 44, pp. 734–742.
- Castle D.M., Montgomery M.T., Kirchman D.L. Effects of naphthalene on microbial community composition in The Delaware estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006, V. 56, pp. 55–63.
- Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 1992, V. 3, pp. 351–368.
- Dalvi S., Azetsu S., Patrauchan M.A., Aktas D.F., Fathepure B.Z. Proteogenomic elucidation of the initial steps in the benzene degradation pathway of a novel halophile, *Arhodomonas* sp. Strain Rozel, isolated from a hypersaline environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, V. 78, pp. 7309–7316.
- Dastgheib S.M.M., Amoozegar M.A., Khajeh K., Shavandi M., Ventosa A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, V. 95, pp. 789–798.
- Ensign J.C., Rittenberg S.C. A crystalline pigment produced from 2-hydro-xypridine by *Arthrobacter crvstallopites* n. sp. *Arch. Mikrobiol.* 1963, V. 47, pp. 137–153.
- Feng T.-C. Cui C.-Z., Dong F., Feng Y.-Y., Liu Y.-D. Yang X.-M. Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3. *Journal of Applied Microbiology.* 2012, V. 113, pp. 779–789.
- Ferrero M., Llobet_Brossa E., Lalucat J. García-Valdés E., Rosselló-Mora R., Bosch R. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western mediterranean region. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, V. 68, pp. 957–962.
- Guo G., He F., Tian F., Huang Y., Wang H. Effect of salt contents on enzymatic activities and halophilic microbial community structure during phenanthrene degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2016, V. 110, pp. 8–15.
- Habe H., Omori T. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, V. 67, N 2, pp. 225–243.
- Kim, D., Kim, S.W., Choi, K.Y., Lee, J.S. Kim, E. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008, V. 280, pp. 235–241.
- Kumar M., Leon V., deSistro Materano A., Ilzins O.A. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensionactive emulsifyingagent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, V. 23, pp. 211–220.
- Martins L.F., Peixoto R.S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2012, ISSN 1517-8382, pp. 865–872.
- McGenity T.J. Halophilic hydrocarbon degraders. In: K. N. Timmis (ed). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Berlin, Springer-Verlag, 2010. pp. 1939–1951.
- Moghadam M. S., Ebrahimipour G., Abtahi B., Ghasempour A., Hashtroudi M.S. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Journal of Environmental Health Science & Engineering.* 2014, 12:114
<http://www.ijehse.com/content/12/1/114>.
- Pec,onek J., Gruber C., Gallego V., Ventosa A., Busse H.-J., Ka¨mpfer P., Radax C., Stan-Lotter H. Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and emended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, V. 56, pp. 1953–1957.
- Sánchez-Porro C, Tokunaga H, Tokunaga M, Ventosa A. *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Japanese salty food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, V. 57, pp. 2262–2266.
- Tagger S., Truffaut N., Le Petit J. Preliminary study on relationship among strains forming a bacterial

community selected on naphthalene from a marine sediment. *Can. J. Microbiol.* 1990, V. 36, pp. 676–681.

Tam N.F., Guo C.L., Yau W.Y., Wong Y.S. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 2002, V. 45, pp. 316–324.

Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular biology reviews.* 1998, V. 62, № 2, pp. 504–544.

Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction // *Meth. Mol. Cell. Biol.* 1994, V. 5, pp. 25–40.

Zaidi B.R., Imam S.H. Factors affecting microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean Coastal Water. *Marine Pollution Bulletin.* 1999, V. 38, N 8, pp. 737–742.

Поступила в редакцию 25.05.2016

Об авторах

Ястребова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; olyastr@mail.ru; (342)2808431

Кошелева Ирина Адольфовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологии плазмид
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
142290, Московская обл., г. Пушкино, Проспект Науки, д. 5; kosheleva@ibpm.pushchino.ru; (095)9257448

Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; peg_el@mail.ru; (342)2808431

профессор кафедры ботаники и генетики растений
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

About the authors

Yastrebova Olga Victorovna, candidate of biology, researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; olyastr@mail.ru; (342)2808431

Kosheleva Irina Adolfovna, candidate of biology, senior researcher of laboratory of plasmids biology
G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, at the Pushchino
142292 Russia, Pushchino, Moscow region, prospect Nauki 5; kosheleva@ibpm.pushchino.ru; (095)9257448

Plotnicova Elena Genrikhovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; peg_el@mail.ru; (342)2808431
professor of the Department of botany and plant genetics
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990